

氏 名	小田 祐輝
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	甲第 6 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	miR-34a のヒト R X R α 発現制御および肝線維化への寄与

論 文 審 査 委 員	主査	中島 美紀
	副査	玉井 郁巳
	副査	加藤 将夫
	副査	中西 猛夫
	副査	檜井 栄一

學位論文要旨

【Abstract】

miR-34a is an anti-oncogenic microRNA and its potential recognition elements were identified in human retinoid X receptor α (RXR α) mRNA. In this study, we investigated the role of miR-34a in liver. Luciferase assays revealed that miR-34a recognizes the element in the coding region of RXR α mRNA. The overexpression of miR-34a in HepG2 cells significantly decreased the endogenous RXR α protein and mRNA stability, indicating that miR-34a negatively regulates RXR α expression by facilitating mRNA degradation. Since the miR-34a-dependent down-regulation of RXR α decreased the induction of CYP26 and the transactivity of CYP3A4, miR-34a would modulate drug metabolism. We next focused on liver fibrosis because p53, which up-regulates miR-34a, has been reported to promote liver fibrosis, while RXR α inhibits collagen synthesis. The p53 activation resulted in an increase of the miR-34a level and a decrease of the RXR α protein level in HepG2 cells. In addition, the miR-34a levels in eight fibrotic human livers were higher than those in six normal livers, and the reverse trend was found for the RXR α protein levels. The hepatic miR-34a was increased in CCl₄-induced fibrotic mouse model. Intravenous administration of anti-miR-34a oligonucleotide encapsulated in liposome mitigated liver fibrosis through inhibiting the activation of hepatic stellate cells and apoptosis. In conclusion, miR-34a negatively regulates the expression of human RXR α and contributes to the incidence or progression of liver fibrosis. This study could provide useful information for developing new therapeutic strategies for of liver fibrosis.

【背景・目的】

MicroRNA (miRNA) は 22 塩基程度の non-coding RNA であり、標的 mRNA の主に 3'非翻訳領域 (3'-UTR) に部分相補的に結合して標的遺伝子の翻訳を抑制、または mRNA を分解することで発現を負に制御することが知られ、遺伝子の転写後調節に関わる重要な因子として近年注目を集めている。miR-34a はほとんどの臓器に発現が認められ、癌遺伝子の発現を抑制することから、癌抑制遺伝子として知られている。細胞の癌化に伴い、miR-34a をコードする遺伝子が存在する染色体の 1p36 領域の一部が欠失することや、miR-34a のプロモーター領域が高メチル化されることが報告されており、癌細胞において miR-34a の発現はジェネティックおよびエピジェネティックな機構により抑制されている。このように miR-34a に関する研究は癌分野において活発に行われている。

Retinoid X receptor α (RXR α) はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属している転写因子であり、retinoic acid receptor (RAR) や pregnane X receptor (PXR) などの受容体とヘテロダイマーを形成し、これらの受容体のリガンドであるビタミンや薬物、脂肪酸等に応答して、薬物代謝酵素や胆汁酸合成酵素といった下流遺伝子の発現を誘導する。RXR α は多くの遺伝子の発現に関わる重要な因子であるが、RXR α 自体の発現調節機構はほとんど明らかにされていない。コンピュータ解析により探索したところ、ヒト RXR α mRNA に miR-34a が結合し得る領域が存在したことから、RXR α の発現調節に miR-34a が関与する可能性が考えられた。

本研究では肝臓における miR-34a の役割を明らかにすることを目的とし、ヒト RXR α 発現に与える miR-34a の影響を解析した。miR-34a の発現誘導に関与する p53 が肝線維化の進行に関与することが報告され、一方で RXR α は肝線維化に対して保護的に働くことが報告され

ていることから、RXR α 発現に与える miR-34a の影響の生理学的、病理学的意義について肝線維化に着目し検討した。続いて四塩化炭素 (carbon tetrachloride, CCl₄) を用いて肝線維化モデルマウスを作製し、肝線維化における miR-34a の役割についてより詳細に検討した。

【結果・考察】

(1) ルシフェラーゼアッセイによるヒト RXR α mRNA 上の MRE の同定

コンピュータ解析により miR-34a が結合し得る領域がヒト RXR α mRNA の 3'-UTR と翻訳領域に 1 箇所ずつ (MRE1、MRE2 と命名) 存在することが示された。それらが機能的であるか調べるために、HEK293 細胞に MRE を含む 130 bp 前後の断片を組み込んだレポータープラスミドを導入し、miR-34a 過剰発現の影響を検討した。Precursor miR-34a (Pre-miR-34a) の導入により miR-34a と相補的な配列を組み込んだ positive control のプラスミド pGL3/c-miR-34a では活性がコントロールの 13% まで低下したことから、導入した pre-miR-34a が機能的に働いていることが示された。しかし、MRE1 を含む断片を組み込んだプラスミドにおいては活性の低下は認められなかった。一方、MRE2 を含む断片を組み込んだプラスミドにおいては有意な活性の低下が認められた。従って、MRE2 が miR-34a により認識され、発現制御に機能的に働いていることが示された。

(2) RXR α 発現に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響

Pre-miR-34a (50 nM) を HepG2 細胞に導入し、72 時間後における RXR α タンパク質発現量に及ぼす miRNA 過剰発現の影響を検討した。その結果 RXR α タンパク質発現量は、pre-miR-34a の導入により有意に低下した。従って miR-34a が RXR α の発現制御に関わることが示唆

された。miR-34a による RXR α タンパク質発現量の低下が、RXR α mRNA 発現量の低下に起因するものか調べるため、miR-34a 過剰発現時の RXR α mRNA 発現量を調べた。導入から 24、48、72 時間後において、negative control #1 を導入した場合と比べて pre-miR-34a 導入により RXR α mRNA 発現量の有意な低下が認められた。

続いて、miR-34a による RXR α mRNA 発現量の低下が mRNA 分解の亢進によるものか調べるため、転写阻害剤である α -アamaniチンを処置し、RXR α mRNA の発現変動を評価した。処置後 3 時間と比較して、negative control #1 を導入した場合、RXR α mRNA 発現量は 6 時間後に 90%まで、9 時間後に 75%まで、12 時間後に 76%まで低下した。一方、pre-miR-34a を導入した場合では、73%、61%、58%まで低下し、negative control #1 と比べていずれの時間においてもその低下率に有意差が認められた。RXR α mRNA 発現量の半減期は、negative control #1 を導入した場合は約 19 時間、Pre-miR-34a を導入した場合は約 12 時間であった。従って、miR-34a は mRNA の分解を亢進することで RXR α の発現を制御していることが示唆された。

(3) CYP26 mRNA 誘導能および CYP3A4 転写活性に及ぼす miR-34a 過剰発現の影響

miR-34a による RXR α タンパク質の発現抑制が下流遺伝子の発現誘導にも影響を及ぼすか調べた。CYP26 はレチノイン酸処置により RAR/RXR α ヘテロダイマーを介して誘導されることが知られている。そこでまず、pre-miR-34a を HepG2 細胞に導入し CYP26 mRNA の誘導能に影響を及ぼすか検討を行った。RAR のリガンドである *all-trans*-retinoic acid または RXR α のリガンドである *9-cis*-retinoic acid を処置することにより、CYP26 mRNA は有意に誘導された (3.2 倍と 4.9 倍)。しかし、pre-miR-34a の導入により、リガンド処置による

CYP26 mRNA の誘導能は消失した (1.6 倍と 1.1 倍)。

同様に、もう 1 つのヘテロダイマーパートナー PXR の下流遺伝子である CYP3A4 への影響も調べた。HepG2 細胞では CYP3A4 mRNA の発現量が低く、誘導も認められなかったため、CYP3A4 遺伝子の上流の PXR/RXR α の結合領域を組み込んだレポータープラスミドを用いて転写活性化能を評価した。PXR のリガンドであるリファンピシンを処置することにより、CYP3A4 の転写活性の有意な上昇が認められたが (4.1 倍)、miR-34a の過剰発現によりその上昇は完全に消失した (1.2 倍)。以上より、miR-34a はヘテロダイマーパートナーに関わらず RXR α の下流遺伝子の誘導も抑制し、薬物代謝に影響を及ぼす可能性が考えられた。

(4) RXR α タンパク質発現量に及ぼす p53 活性化の影響

miR-34a による RXR α の発現制御の生理学的小および病理学的意義について、肝線維化に着目して検討した。miR-34a の発現は癌抑制遺伝子 p53 の活性化により誘導されることが知られている。これまでに p53 が線維化の促進に関与する connective tissue growth factor の発現を誘導することで肝線維化の進行に関与すること、RXR α が肝線維化に対して保護的に働くことが報告されている。以上より、miR-34a を介した RXR α の発現低下は肝線維化の進行に関与している可能性が考えられた。そこで、p53 活性化による miR-34a の発現誘導が RXR α タンパク質発現量に影響を及ぼすか、p53 活性化能を有するエトポシドを HepG2 細胞 (野生型 p53 発現細胞株) に処置し検討を行った。エトポシドの処置により p53 の下流遺伝子である p21 mRNA 発現量の 9.9 倍の上昇が認められ、p53 が活性化されていることが示された。またその時、mature miR-34a 発現量も有意な上昇 (1.5 倍) を示し、RXR α タンパク質発現量の有意な低下 (82%) が認められた。続いて変異型

p53 発現細胞株である HuH7 細胞にエトポシドを処置し同様の検討を行った。HepG2 細胞と異なり、HuH7 細胞では p21 mRNA、mature miR-34a 発現量、RXR α タンパク質発現量に変化は認められなかった。以上より、p53 の活性化を介した miR-34a の誘導は RXR α の発現を低下させることが示唆された。

(5) 線維化の認められる肝における mature miR-34a と RXR α タンパク質発現量の解析

miR-34a による RXR α の発現制御と肝線維化との関連を明らかにするため、線維化ヒト肝サンプルを用いて mature miR-34a と RXR α タンパク質発現量を測定し、正常肝サンプルと比較した。正常肝組織と比べて線維化の認められる肝組織では mature miR-34a は有意ではないものの ($P = 0.08$) 高値を示す傾向が認められ、一方、RXR α タンパク質発現量は有意に ($P < 0.05$) 低い値を示した。また、mature miR-34a と RXR α タンパク質発現量との間には有意な ($R_s = -0.79, P < 0.001$) 逆相関関係が認められた。従って、miR-34a の高発現が RXR α による保護作用を破綻させ、線維化の悪化に関与していることが示唆された。

(6) CCl₄ 誘導性肝線維化マウスモデルにおける mature miR-34a の発現変動解析

miR-34a が肝線維化のどの段階で発現変動しているか調べるため、肝線維化を引き起こす化学物質として頻用されている CCl₄ (1 mL/kg in olive oil) を C57BL/6J マウスに 1~8 週間腹腔内投与して肝線維化モデルを作製し、肝臓における mature miR-34a 発現量を測定した。CCl₄ 群は投与 1 週目からオリーブ油群と比べて mature miR-34a 発現量が有意に高値を示し、その上昇の程度は CCl₄ の投与期間に関わらず一

定であった (5~8 倍)。従って、miR-34a は肝線維化の初期段階から発症または進行に関与していることが示唆された。

(7) 肝線維化発症への miR-34a ノックダウンの影響

miR-34a ノックダウンによる肝線維化の発症への影響を調べるために、CCl₄ 投与前に脂質膜に包んだ miR-34a に対するアンチセンスオリゴ (AMO34a MEND) を投与し、翌日より CCl₄ を 1 週間反復投与して検討した。Mature miR-34a 発現量は、CCl₄ 投与によりオリーブ油投与と比べて 5 倍高値を示し、その上昇は AMO34a MEND 投与により抑制された。病理組織学的評価を行ったところ、CCl₄ 投与により認められた細胞死 (hematoxylin・eosin 染色)、および一部のコラーゲン沈着 (picrosirius red 染色) が、AMO34a MEND 投与により減弱していた。従って、miR-34a は肝線維化の発症に関与しており、AMO miR-34a は肝線維化に対して予防作用があることが示された。

AMO34a MEND 投与による肝線維化への予防作用をより詳細に調べるため、活性化した肝星細胞高発現する α SMA の mRNA 発現量を測定した。 α SMA mRNA 発現量は CCl₄ 投与により上昇し、その上昇は AMO34a MEND 投与により抑制される傾向が認められた。肝線維化は肝細胞が障害され、それに対する創傷治癒の結果、コラーゲンなどの細胞外マトリクスが過剰に蓄積した状態である。miR-34a は抗アポトーシス遺伝子を発現抑制することでアポトーシスを誘導することが知られていることから、アポトーシスのマーカーである cytochrome c タンパク質発現量への影響を調べた。Cytochrome c タンパク質発現量は CCl₄ 投与により上昇し、その上昇は AMO34a MEND 投与により有意に抑制された。以上より、AMO miR-34a は肝星細胞の活性化や増殖、コラーゲン沈着、アポトーシスを減弱させることにより肝線維化の発症を抑制することが示された。

(8) 肝線維化進行への miR-34a ノックダウンの影響

miR-34a ノックダウンにより肝線維化の進行に対しても抑制作用が認められるか調べるために、4 週間 CCl₄ を反復投与して肝線維化を進行させている条件下、CCl₄ 投与開始から 21 日目に AMO34a MEND を単回投与し、肝線維化に対する修復能を検討した。病理組織学的評価を行ったところ、5 匹中 2 匹においてコラーゲンの沈着の減弱が認められた。αSMA mRNA 発現量は CCl₄ 投与により上昇し、その上昇は AMO34a MEND 投与により抑制される傾向が認められた。以上より、miR-34a をノックダウンすることで線維化の修復も期待できることが示された。

【結論】本研究では、miR-34a がヒト RXRα発現およびその下流遺伝子である代謝酵素の誘導を抑制することを明らかにした。これまで miR-34a に関する研究は癌領域を中心に行われてきたが、今回の検討により肝線維化の発症、進行にも寄与することが示され、肝線維化の治療効果の向上や副作用の軽減に向けて有用な情報を提供することができた。

審査結果の要旨

MicroRNA はタンパク質をコードしない一本鎖 RNA であり転写後調節を担う主要な因子である。本研究は、肝臓における microRNA の機能に着目し、多くの薬物代謝酵素等の発現を調節する転写因子 retinoid X receptor α (RXR α)が microRNA で制御される可能性およびその生体における意義を明らかにすることを目的としたものである。ヒト肝臓中 RXR α は miR-34a によって負に制御されており、薬物代謝酵素の発現に影響を及ぼしていることを示した。また、RXR α は肝線維化に対して保護的に働き、一方で miR-34a を発現誘導する p53 は促進的に働くことが報告されていることから、RXR α 発現に与える miR-34a の影響の意義について肝線維化に着目した研究を展開した。p53 を介した miR-34a の発現誘導が RXR α タンパク質発現量を低下させること、線維化ヒト肝で miR-34a 発現量が高値を示す一方で、RXR α タンパク質発現量は低値を示すことを明らかにした。さらには、肝線維化モデルマウスを用いて、miR-34a 機能阻害により肝線維化の発症および進行が抑制されることを明らかにした。以上、本研究成果は、miR-34a が薬物代謝能に影響を及ぼすのみならず、肝線維化の発症および進行に寄与することを示し、肝線維症の新たな治療法の開発に有益な知見を与えたものであり、博士 (創薬科学) に値すると判定した。